UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOCHEMIE DES ABBAUES VON ÄPFELSÄURE DURCH BAKTERIUM GRACILE MIT HILFE ^{14}C-MARKIERTER SÄUREN

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität

zu Mainz

Hanns-Ludwig SCHMIDT

geboren in Trier/Mosel

Mainz 1959

Mit Genehmigung der Fakultät gekürzt.

Mikrofilm der ungekürzten Arbeit liegt in der Universitätsbibliothek vor.

Die natürliche Entsäuerung von Weinen geschieht durch Einwirkung von Bakterien auf L-Äpfelsäure, welche unter Bindung eines Äquivalentes Wasserstoffionen zu DL-Milchsäure und Kohlendioxyd abgebaut wird.

$$^{-}OOC—CH_2—CHOH—COO^{-} + H^{+} \longrightarrow CH_3—CHOH—COO^{-} + CO_2$$

Der Abbau verläuft über Oxalessigsäure und Brenztraubensäure oder, bei oxydativer Dekarboxylierung („malic"-Enzym), über Brenztraubensäure allein.

Berechnungen aus Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte zeigen, daß der Abbau der Äpfelsäure ein exergoner Prozeß ist, der jedoch keinen Nutzeffekt hat. Zur Energiegewinnung kommt er deshalb nicht in Frage.

Eine Verwendung der Äpfelsäure im Energiestoffwechsel von B. gracile würde daher ihren aeroben Weiterabbau bedingen. Eine geringe Sauerstoffaufnahme ruhender Bakterien im Warburg-Versuch ist festzustellen. Der Sauerstoff dient möglicherweise der Oxydation von Milchsäure zu Essigsäure, wenn den Bakterien als einzige Kohlenstoffquelle Äpfelsäure angeboten wird. Glukose fördert diesen Sauerstoffverbrauch und hemmt gleichzeitig den Äpfelsäureabbau, letzteres möglicherweise, weil die durch Glykolyse entstehende Milchsäure eine Verschiebung des p_H-Wertes im Zellinnern vom Optimum des „malic"-Enzyms bewirkt.

Ein neben der Äpfelsäuregärung ablaufender aerober Abbau dieser Säure müßte sich durch eine Verschiebung des Verhältnisses der gebildeten Mengen an Kohlendioxyd und Milchsäure anzeigen. Die Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Elution von Papierchromatogrammen in Kombination mit einer nassen Verbrennung der eluierten Substanzen sowie die Verwendung von Gaszählrohren erlaubte den Einsatz ^{14}C-markierter Säuren für Bilanzversuche. DL-Äpfelsäure—(1,4—$^{14}C_2$) wird von wachsendem B. gracile zu etwa 60 Prozent abgebaut; es wird also auch ein Teil der D-Form angegriffen. Bei der Reaktion entstehen Milchsäure—(1—^{14}C) und $^{14}CO_2$ in etwa äquivalenten Mengen; die Milchsäure enthält sogar etwas mehr Aktivität als das Kohlendioxyd. Das Arbeiten mit ruhenden Bakterien führt zu dem gleichen Ergebnis. Auch hier wird nicht mehr Kohlendioxyd

R. UNIV. BIBLIOTHEEK

als Milchsäure gebildet. Ein nennenswerter Abbau der Äpfelsäure über die Milchsäure hinaus ist also auszuschließen.

Fumarsäure—(1,4—$^{14}C_2$) wird über Äpfelsäure langsam in die gleichen genannten Endprodukte abgebaut. Die beiden Dikarbonsäuren wie auch Zitronensäure—(1,5—$^{14}C_2$) finden im Aufbaustoffwechsel der Bakterien keine Verwendung, da in der Zellsubstanz von Bakterien, deren Nährmedium diese Säuren zugesetzt waren, keine Radioaktivität nachzuweisen ist. Aus Milchsäure—(1—^{14}C) wird eine geringe Menge Äpfelsäure gebildet; ebenso entstehen aus ihr Spuren von $^{14}CO_2$. Diese Mengen sind aber so gering, daß man wiederum einen Abbau der Äpfelsäure über die Milchsäure hinaus verneinen kann.

Zitronensäure wird von zwei untersuchten Stämmen des B. gracile nur sehr wenig angegriffen. Als einziges Stoffwechselprodukt fand sich dabei bisher $^{14}CO_2$.

Die Bakterienkulturen lassen sich in lyophilisiertem Zustand über Monate keimfähig halten. Für die Überlebensrate beim Einfrieren spielt die Art des Mediums, in dem sie suspendiert sind, eine entscheidende Rolle. Am besten eignen sich frische Nährlösungen.

Zum Nachweis des „malic"-Enzyms nach S. Ochoa wurde das Verhalten von Extrakten aus B. gracile und L. arabinosus bei der Dekarboxylierung von Äpfelsäure in Kohlendioxydatmosphäre untersucht. Die Hemmung der genannten Reaktion durch steigenden Partialdruck des Kohlendioxyd ist bei beiden Bakterienstämmen völlig gleich und stimmt auch mit der von S. Ochoa bei einem Stamm von L. arabinosus gefundenen überein. Unter erhöhtem Druck (bis 9 atm. CO_2) erleidet auch der Äpfelsäureabbau durch lebende Bakterien eine Verzögerung, die mit einer Wachstumshemmung parallel läuft.

Die Äpfelsäure kommt also für B. gracile als Energie- oder Kohlenstoffquelle nicht ein Betracht; sie wird praktisch ausschließlich zu Milchsäure und Kohlendioxyd abgebaut.

Der präparative Teil der Arbeit bringt die Darstellung von Natriumlaktat—(1—^{14}C) und von Zitronensäure—(1,5—$^{14}C_2$).

Lebenslauf

Am 17. Januar 1930 wurde ich als Sohn des Gerichtsreferendars Wilhelm Schmidt und seiner Ehefrau Maria geb. Piro in Trier-Mosel geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1936 bis 1939 in Baumholder-Nahe. Von 1939 bis 1949 war ich Schüler der Jungenoberschule in Saarlouis. Durch Kriegsereignisse wurde meine Ausbildung an dieser Schule zweimal für längere Zeit unterbrochen. Nach Ablegung der zentralen Reifeprüfung in Saarbrücken wurde ich im Wintersemester 1949/50 an der Universität Dijon (Frankreich) zum Studium der Naturwissenschaften immatrikuliert. Seit Sommersemester 1950 studierte ich in Mainz Chemie. Dort bestand ich 1954 das Diplomvorexamen und 1956 das Diplomexamen. Die Diplom- und Doktorarbeit führte ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. D. Jerchel auf biochemischem Gebiet aus. Die Promotionsprüfung legte ich am 16. Oktober 1959 ab.

Während verschiedener Semesterferien war ich in Laboratorien der Industrie beschäftigt. Neben dem Studium der Chemie nahm ich an Vorlesungen und Übungen des vorklinischen Medizinstudiums teil.

Ich bin verheiratet und habe ein Kind.

Dekan:	Professor Dr. H. Albers
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Jerchel
2. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Kern

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Oktober 1959

Datum des Diploms 16. OKT. 1959